

**PENGARUH EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP PENEKANAN
EKSPRESI PROTEIN CYCLIN D1, PENINGKATAN EKSPRESI
PROTEIN BAX DAN INDUKSI APOPTOSIS PADA
KULTUR SEL KANKER SERVIK
(*HELA CELL LINE*)**

TESIS

**Disusun untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Magister
Program Studi Magister Kedokteran Keluarga
Minat Utama Ilmu Biomedik**



Oleh:

Irma Febrina

S 501202036.

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
SURAKARTA
2016**

**PENGARUH EKSTRAK PROPOLIS TERHADAP PENEKANAN
EKSPRESI PROTEIN CYCLIN D1, PENINGKATAN EKSPRESI
PROTEIN BAX DAN INDUKSI APOPTOSIS PADA
KULTUR SEL KANKER SERVIK
(*HELA CELL LINE*)**

TESIS

Oleh

Irma Febrina

S 501202036

Telah disetujui oleh Tim Pembimbing

Komisi Pembimbing	Nama	Tanda Tangan	Tanggal
Pembimbing I	Suradi Maryono,dr, Sp.PD- KHOM, FINASIM NIP.194708121973101001
Pembimbing II	Prof.Dr.dr. H.M.Bambang Purwanto, SpPD,KGH, FINASIM NIP.194807191976091001

Telah dinyatakan memenuhi syarat

Pada tanggal

Ketua Program Studi Magister Kedokteran Keluarga
Program Pascasarjana UNS

Prof.Dr.A.A. Subiyanto,dr,MS
NIP. 194811071973101003

PERNYATAAN KEASLIAN DAN PERSYARATAN PUBLIKASI

Penulis menyatakan dengan sebesar-besarnya bahwa:

1. Tesis yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Propolis Terhadap Penekanan Ekspresi Protein *Cyclin D1*, Peningkatan Ekspresi protein *Bax* Dan Induksi Apoptosis Pada Kultur Sel Kanker Servik (*Hela Cell Line*)” ini adalah karya penelitian penulis sendiri dan tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik serta tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang tertulis dengan acuan yang disebutkan sumbernya, baik dalam naskah karangan dan daftar pustaka. Apabila ternyata di dalam naskah tesis ini dapat dibuktikan terdapat unsur plagiarasi, maka penulis bersedia menerima sanksi, baik Tesis beserta gelar magister penulis dibatalkan serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.
2. Publikasi sebagian atau keseluruhan isi Tesis pada jurnal forum ilmiah harus menyertakan tim promotor sebagai *author* dan PPs UNS sebagai institusinya. Apabila penulis melakukan pelanggaran dari ketentuan publikasi ini, maka penulis bersedia mendapatkan sanksi akademik yang berlaku.

Surakarta, Oktober 2016

Irma Febrina
S501202036.

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillahirabbil'aalamin penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala limpahan kasih sayang, rahmat dan hidayah-Nya sehingga penyusunan usulan tesis yang berjudul: Pengaruh Ekstrak Propolis Terhadap Penekanan Ekspresi Protein *Cyclin D1*, Peningkatan Ekspresi protein *Bax* Dan Induksi Apoptosis Pada Kultur Sel Kanker Servik (*Hela Cell Line*) ini dapat terselesaikan dengan baik. Penelitian ini untuk memenuhi sebagian persyaratan dalam memperoleh Gelar Spesialis Penyakit Dalam Program Pendidikan Dokter Spesialis I Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang tulus dan penghargaan yang tinggi kepada:

1. Prof. Dr. Ravik Karsidi, M.S., selaku Rektor Universitas Sebelas Maret Surakarta yang telah memberikan kemudahan penulis dalam melaksanakan pendidikan Pascasarjana Program studi Magister Kedokteran Keluarga minat utama Biomedik.
2. Prof. Dr. dr. Hartono, M.Si selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Sebelas Maret Surakarta, yang telah memberikan kemudahan dan dukungan kepada penulis selama menjalani pendidikan PPDS Ilmu Penyakit Dalam.
3. dr. Endang Agustinar, M.Kes sebagai Direktur RSUD Dr. Moewardi beserta seluruh jajaran staf direksi yang telah berkenan dan mengijinkan untuk menjalani program pendidikan PPDS interna.
4. dr . Suradi Maryono, SpPD, KHOM, FINASIM selaku Pembimbing I yang telah membimbing dan memberikan pengarahan dalam penyusunan tesis ini,serta memberikan kemudahan penulis dalam melaksanakan program pendidikan Pascasarjana dan PPDS I Ilmu Penyakit Dalam.
5. Prof. Dr. dr. HM. Bambang Purwanto, SpPD, KGH, FINASIM selaku Pembimbing II dan Kepala Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK UNS/ RSUD Dr

Moewardi yang telah memberikan ijin, bimbingan dan pengarahan dalam penyusunan usulan tesis ini,serta memberikan kemudahan penulis dalam melaksanakan program pendidikan Pascasarjana dan PPDS I Ilmu Penyakit Dalam.

6. Drs. Sumardi, MM selaku pembimbing/ konsultan statistik penelitian, yang dengan kesabaran telah membimbing dan memberikan pengarahan dalam penyusunan usulan tesis.
7. Dr. dr. Hari Wujoso, SpF, MM selaku Penguji I, yang telah memberikan pengarahan, bimbingan dan koreksi dalam penyusunan tesis ini.
8. Dr. Noer Rachma, dr., Sp.KFR selaku Penguji II, yang telah memberikan pengarahan, bimbingan dan koreksi dalam penyusunan tesis ini.
9. Seluruh Staf Pengajar Ilmu Penyakit Dalam FK UNS/ RSUD Dr Moewardi Surakarta. Prof. Dr. dr. H A Guntur Hermawan SpPD KPTI FINASIM (alm), Prof.Dr.dr. Djoko Hardiman, SpPD KEMD FINASIM, dr. Suradi Maryono, SpPD KHOM FINASIM, dr. Sumarmi Soewoto SpPD KGER FINASIM, dr. Tatar Sumandjar, SpPD KPTI FINASIM, dr. Tantoro Harmono, SpPD KGEH FINASIM, dr. Tri Yuli Pramana SpPD KGEH FINASIM, dr. Supriyanto Kartodarsono, SpPD KEMD FINASIM, dr. Supriyanto Muktiatmojo, SpPDFINASIM, dr. Dhani Redhono, SpPD KPTI FINASIM, dr. Wachid Putranto, SpPD KGH FINASIM, dr. Arifin, SpPD KIC FINASIM, dr. Fatichati Budiningsih, SpPD KGer FINASIM, dr. Agung Susanto SpPD FINASIM, dr. Arief Nurudin SpPD FINASIM, dr. Agus Joko Susanto SpPD, FINASIM, dr. Yulyani Werdiningsih, SpPD FINASIM, dr.Sri Marwanta SpPD Mkes, dr.Aritantri D SpPD MSc, dr. Bayu Basuki Wijaya SpPD Mkes, dr.R. Satriyo SpPD Mkes, dr. Evi Nurhayatun SpPD Mkes, dr. Eva N SpPD Mkes, dr. Ratih Tri K SpPD, dr. Yudhi Hadjianto Sp.PD Mkes, dr. Agus Jati, Sp.PD, dr. Nurhasan Agung, SpPD Mkes, dr. Aryo Suseno, SpPD Mkes, dr Ratih Arianita, SpPD,Mkes yang telah memberi dorongan, bimbingan dan bantuan dalam segala bentuk sehingga penulis bisa menyelesaikan penyusunan tesis.

10. Ayahanda dan Ibunda tercinta H. Syamsudin tohir dan Hj. Siti Aminah, Orang tua yang kami hormati dan sayangi Bapak H. Yusuf Amin dan Ibu Hj Sumarmi, Suamiku tercinta dr.Opi Zianul Hak Sp.B, M.Kes, buah hatiku Radithia Fathi Zianul Haq,Raffa Tadzkira Zianul Haq, Radisty Aisha Zianul Haq, saudara kandung, saudara ipar yang telah memberikan kasih sayang dan semangat dengan sabar dan tulus memberikan dorongan moril dan materiil dalam penyelesaian tesis ini dan proses menjalani program pendidikan Pasca Sarjana dan PPDS I Ilmu Penyakit Dalam.
11. Seluruh teman sejawat seperjuangan Residen Penyakit Dalam yang telah memberikan dukungan dan bantuan kepada penulis dalam penelitian ini dan selama menjalani pendidikan.
12. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu, yang telah membantu penulis baik dalam menjalani pendidikan maupun dalam persiapan penelitian ini.

Penyusun menyadari bahwa dalam penyusunan dan penulisan tesis ini masih banyak terdapat kekurangan, untuk itu penyusun mohon maaf dan sangat mengharapkan saran serta kritik dalam rangka perbaikan penulisan tesis ini.

Surakarta, Oktober 2016

Penyusun

Irma Febrina (S501202036). Pengaruh Ekstrak Propolis terhadap penekanan Ekspresi Protein *Cyclin D1*, peningkatan ekspresi protein *Bax* dan induksi apoptosis pada kultur sel kanker servik (*Hela Cell Line*). TESIS. Pembimbing I. Dr. Suradi Maryono, SpPD-KHOM, FINASIM. Pembimbing II: Prof DR. Dr. H. Bambang Purwanto, SpPD-KGH, FINASIM. Program Studi Kedokteran Keluarga, Pascasarjana, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

ABSTRAK

Latar Belakang : Kanker serviks merupakan kanker ginekologi tertinggi di dunia dengan penyebab tersering infeksi *Human Papilloma Virus* (HPV) Di Indonesia, kanker serviks merupakan keganasan yang paling banyak ditemukan dan penyebab kematian utama pada perempuan dalam tiga dasa warsa terakhir. Di Indonesia, setiap tahun terdeteksi lebih dari 15.000 kasus kanker serviks dan sekitar 8.000 kasus di antaranya berakhir dengan kematian. Terdapat beberapa jenis pengobatan yang biasa diberikan pada penderita kanker serviks, namun hasilnya relatif belum optimal. Keadaan ini mendorong usaha penemuan dan pengembangan strategi terapi yang baru dalam melawan kanker. Pendekatan yang menarik untuk dikembangkan adalah penggunaan kombinasi kemoterapi atau ko-kemoterapi. Salah satu produk natural yang potensial untuk dikembangkan sebagai agen ko-kemoterapi adalah propolis.

Tujuan Penelitian : Mengetahui pengaruh pemberian propolis yang berasal dari Kerjo, Karanganyar, Jawa Tengah Indonesia terhadap induksi proses apoptosis dan aktivitas antiproliferasi, terutama terkait dengan penekanan ekspresi protein *Cyclin D1* dan peningkatan ekspresi protein *Bax* pada kultur sel hela (*cell line* kanker servik).

Metode Penelitian : Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan *post test with control group design*. Penelitian dilakukan pada kultur sel hela (sel kanker servik) dengan pemberian propolis. Pengamatan ekspresi protein *Cyclin D1* dan ekspresi protein *Bax* dilakukan dengan metode imunositokimia, sedangkan pengamatan induksi apoptosis dilakukan dengan *flowcytometry*. Analisis statistik menggunakan uji *Kruskall Wallis* dilanjutkan *Mann WhutneyU test*. Signifikan bila $p < 0.05$.

Hasil Penelitian : Rata-rata ekspresi *Cyclin D1* pada kelima kelompok yaitu kontrol $83.56,13 \pm 1,46 \mu\text{g/ml}$, EEP 1/2 IC_{50} $60,76 \pm 4,21$, EEP IC_{50} $36,56 \pm 3,63 \mu\text{g/ml}$, EEP 2 IC_{50} $24,92 \pm 5,14 \mu\text{g/ml}$, Cisplatin $13,15 \pm 3,66 \mu\text{g/ml}$. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi *Cyclin D1* antara kelompok uji dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,001$). Rata-rata ekspresi *Bax* pada kelima kelompok yaitu kontrol $1,89 \pm 0,46 \mu\text{g/ml}$, EEP 1/2 IC_{50} $69,44 \pm 1,39$, EEP IC_{50} $80,07 \pm 3,52 \mu\text{g/ml}$, EEP 2 IC_{50} $83,96 \pm 3,26 \mu\text{g/ml}$, Cisplatin $92,78 \pm 4,68 \mu\text{g/ml}$. Terdapat perbedaan bermakna ekspresi *Bax* antara kelompok uji dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,001$).

Kesimpulan : Pemberian ekstrak etanol propolis mempunyai pengaruh terhadap penekanan ekspresi *Cyclin D1*, peningkatan ekspresi *Bax*, dan induksi apoptosis pada kultur sel kanker servik (*Hela Cell Line*).

Kata kunci : EEP, *Cyclin D1*, protein *Bax*, sel Hela

Irma Febrina (S501202036). The Effect of Propolis Extract for decreasing the expression of *Cyclin D1* Protein, elevated expression of *Bax* protein and apoptotic induction on cultured cell cervical cancer (*Hela Cell Line*). THESIS. Supervisor I. Dr. Suradi Maryono, SpPD-KHOM, FINASIM. Supervisor II: Prof. DR. Dr. H. Bambang Purwanto, SpPD-KGH, FINASIM. Study Program of Family Medicine, Master program, University of Sebelas Maret Surakarta.

ABSTRACT

Background : Cervical cancer is the highest-prevalence for gynecologic cancer in the world predominantly caused by Human Papilloma Virus (HPV) infection. In Indonesia, cervical cancer is the most common malignancy and the leading cause of death in women in the last three decades. In Indonesia, there are more than 15,000 detected cases every year for cervical cancer and 8,000 cases of them led to death. There are few treatment options that are usually given to patients with cervical cancer, but the results have not been relatively optimal. This condition encourages work for the discovery and development of new therapeutic strategies against cancer. An interesting approach to be investigated is the combination use of chemotherapy or co-chemotherapy. Co-chemotherapy is a cancer treatment strategy by combining a non-toxic chemopreventive compound with chemotherapy agent. One of potential natural products to be introduced as co-chemotherapy agent is propolis.

Purposes : To know the effect of propolis originating from Kerjo, Karanganyar, Central Java, Indonesia on the induction of apoptosis process and anti-proliferation activities, mainly associated with suppression of Cyclin D1 protein expression, and increased expression of *Bax* protein in *hela* cell culture (cervical cancer cell line).

Methods: This study is a laboratory experimental study using *post test with control group design*. The study was conducted on *hela* cell cultures (cervical cancer cells) by administering propolis. Observation of Cyclin D1 protein expression and expression of *Bax* protein was conducted using immunocytochemistry, while induction of apoptosis observations carried out by using a flow cytometry. Statistical analysis was further conducted by using Kruskal Wallis continued by using Mann Whitney U test. Significant P value was < 0.05 .

Results: The average expression of Cyclin D1 in five groups: control $83.56, 13 \pm 1,46 \mu\text{g} / \text{ml}$, EEP 1/2 IC50 $60.76 \pm 4,21$, $36.56 \pm 3,63 \mu\text{g}$ EEP IC50 / ml, EEP 2 IC50 $24.92 \pm 5,14 \mu\text{g} / \text{ml}$, $13.15 \pm 3,66 \mu\text{g}$ Cisplatin / ml. There is a significant difference between the expression of Cyclin D1 among work groups than control ($p < 0.001$). The average expression of *Bax* in five groups: control $1,89 \pm 0,46 \mu\text{g} / \text{ml}$, EEP 1/2 IC50 69.44 ± 1.39 , $80.07 \pm 3,52 \mu\text{g}$ EEP IC50 / ml, EEP 2 IC50 $83,96 \pm 3,26 \mu\text{g} / \text{ml}$, $92.78 \pm 4,68 \mu\text{g}$ Cisplatin / ml. There are significant differences between *Bax* expression between work group than control ($p < 0.001$).

Conclusion: The ethanol extract of propolis has an influence on the expression of Cyclin D1 suppression, increased expression of *Bax* and induction of apoptosis in cultured cells of cervical cancer (*Hela Cell Line*).

Keywords: EEP, *Cyclin D1*, *Bax* protein, *Hela cell line*

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang Masalah	1
B. Rumusan Masalah	6
C. Tujuan Penelitian	7
1. Tujuan umum	7
2. Tujuan khusus	7
D. Manfaat penelitian	7
1. Aspek teoritis	7
2. Aspek praktis	7
BAB II. LANDASAN TEORI.....	8
A. Tinjauan Pustaka	8
1. Kanker.....	8
2. Kanker Servik.....	9
3. Sel Hela.....	11
4. Siklus sel.....	15
5. Protein Cyclin d1.....	17
6. Apoptosis.....	19
7. Proterin Bax	24
8. Propolis.....	24
a. Definisi Propolis.....	24
b. Kandungan Kimia Propolis.....	26
c. Pengaruh propolis Terhadap Proses Apoptosis Sel Kanker....	29
d. Pengaruh Propolis Terhadap Proliferasi Sel Kanker.....	31

e. Ekstraksi Propolis.....	32
B. Penelitian yang relevan	33
C. Kerangka Konseptual	36
D. Kerangka Konsep penelitian	39
E. Hipotesis Penelitian	40
BAB III. METODE PENELITIAN	39
A. Tempat dan Waktu	41
B. Jenis Penelitian	42
C. Subjek Penelitian dan Besar Sampel	42
D. Identifikasi Variabel	43
1. Variabel bebas	43
2. Variabel terikat	43
E. Definisi Operasional	43
F. Bahan dan Alat penelitian	46
G. Alur Penelitian	49
H. Analisis Hasil	58
BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	61
A. Hasil Penelitian.....	61
1. Uji sitotoksitas dengan MTT aasay.....	62
2. Pengamatan penekanan EkspresiCyclin d1.....	66
3. Pengamatan Ekspresi protein Bax.....	70
4. Uji Induksi Apoptosis dengan Flowcytometry.....	74
B. Pembahasan	78
1. Aspek Ontologi	78
2. Aspek Epistemiologi	80
3. Aspek Aksiologi	83
4. Nilai Kebaharuan Penelitian	83
C. Keterbatasan Penelitian.....	80
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	86
DAFTAR PUSTAKA	88

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Siklus Sel.....	15
Gambar 2.	Ekspresi Cyclin.....	17
Gambar 3.	Jalur Apoptosis.....	21
Gambar 4.	Diagram Jalur P53.....	23
Gambar 5.	Kerangka Konseptual.....	36
Gambar 6.	Kerangka Konsep penelitian.....	39
Gambar 7.	Skema pengisian plat mikrokultur.....	52
Gambar 8.	Skema Pengisian platEkspresi Cyclin d1 dan Bax.....	54
Gambar 9.	Alur Penelitian.....	58
Gambar 10.	Morfologi Sel Hela.....	62
Gambar 11	Pembentukan Kristal Formazan.....	63
Gambar 12.	Hasil Imunositokima ekspresi Cyclin d1.....	67
Gambar 13.	Grafik Presentase Cyclin d1.....	69
Gambar 14.	Hasil Imunositokima Ekspresi Bax.....	71
Gambar 15.	Grafik Presentase Ekspresi Bax.....	73
Gambar 16	Apoptosis Sel Hela Inkubasi 24 Jam.....	75
Gambar 17.	Hasil Flowcytometri.....	76
Gambar 18.	Nilai Kebaruan Penelitian	84

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Senyawa propolis.....	28
Tabel 2.	Jadwal penelitian.....	41
Tabel 3.	Persentase hambatan proliferasi.....	65
Tabel 4.	Persentase Ekspresi cyclin d1.....	68
Tabel 5.	Persentase Eksresi bax.....	72
Tabel 6.	Persentase apoptosis sel HeLa	77

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Absorbansi sel Hela dengan MTT assay
- Lampiran 2. Hasil Persentase viabilitas sel hela
- Lampiran 3. Analisis regresi linier IC50 EEP
- Lampiran 4. Hasil analisis statistik ekspresi Bcl2 dan p21
- Lampiran 5. Hasil Flowcytometry.
- Lampiran 6. Hasil analisis statistik apoptosis.
- Lampiran 7. Dokumentasi hasil penelitian.

DAFTAR SINGKATAN

WHO	: <i>World Health Organization</i>
NFkB	: <i>Nuclear factor kappa B</i>
<i>Bcl</i>	: <i>B-cell lymphoma</i>
DNA	: <i>Deoksiribonukleat Acid</i>
RB	: <i>Retinoblastoma</i>
CDK	: <i>Cyclin dependent kinase</i>
CIN	: <i>Cromosomal Instability</i>
MIN	: <i>Microsatellite Instability</i>
MMR	: <i>Missmatch repair</i>
APC	: <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
DCC	: <i>Deleted in Colon Cancer</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothel Growth Factor</i>
EGFR	: <i>Endotheal Growth Factor Receptor</i>
COX2	: <i>Cyclooxygenase-2</i>
pGP	: <i>P-glikoprotein</i>
TNFR	: <i>Necrosis Factor Receptor</i>
TRADD	: <i>TNF receptor-associated death domain</i>
FADD	: <i>Fas-associated death domain</i>
DISC	: <i>Death-inducing singnalling complex</i>
PS	: <i>phosphatidyl serine</i>
CAPE	: <i>Caffeic Acid Phenethyl Ester</i>

EEP : *Ekstrak etanol propolis*

NFAT : *Nuclear factor of activated cells*

AP-1 : *Activator protein-1*